



(19) BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

(12) Offenlegungsschrift
(10) DE 195 42 986 A 1

(51) Int. Cl. 6:
C 07 D 493/08

C 07 D 493/18
C 07 D 417/06
C 07 D 497/08
C 07 F 7/07
A 01 N 43/90
C 07 F 9/655
A 61 K 31/425

DE 195 42 986 A 1

(21) Aktenzeichen: 195 42 986.9
(22) Anmeldetag: 17. 11. 95
(43) Offenlegungstag: 22. 5. 97

// (C07D 493/08,303:00,315:00) (C07D 493/18,303:00,315:00,321:00) (C07D 497/08,303:00,315:00,327:00)
(C07D 417/06,277:24, 303:12) (C07D 417/06,277:24,315:00)

(71) Anmelder:

Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH
(GBF), 38124 Braunschweig, DE

(74) Vertreter:

Patentanwälte Dr. Boeters, Bauer, Dr. Meyer, 81541
München

(72) Erfinder:

Höfle, Gerhard, Prof. Dr., 38124 Braunschweig, DE;
Kiffe, Michael, Dr., 38124 Braunschweig, DE

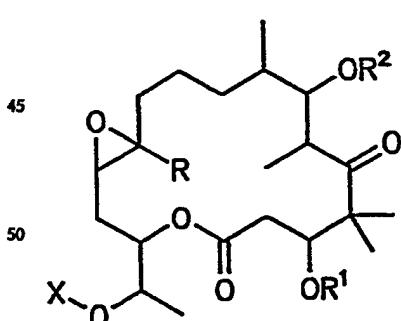
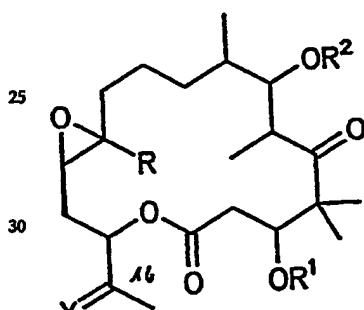
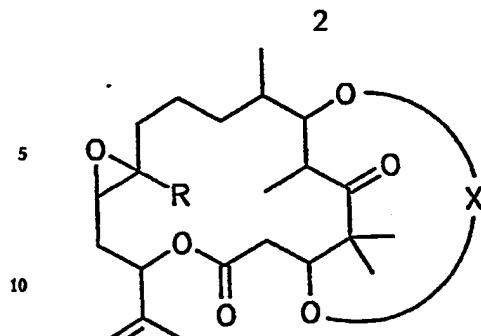
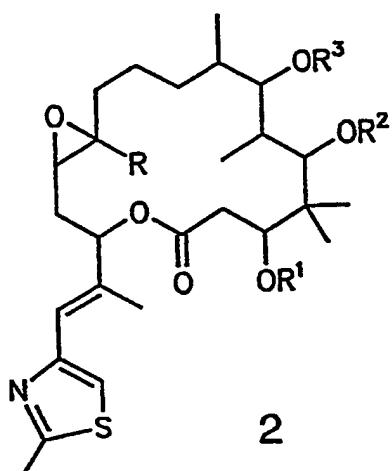
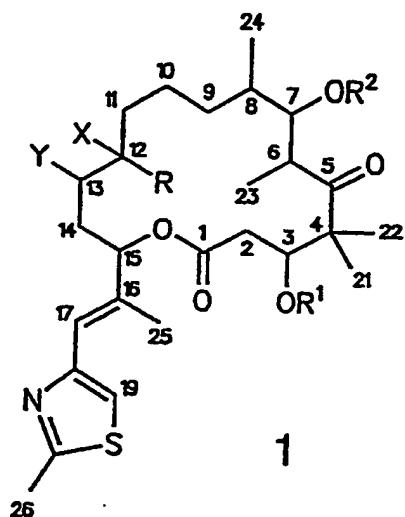
(54) Epothilon-Derivate und deren Verwendung

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft Epothilonederivate und
deren Verwendung.

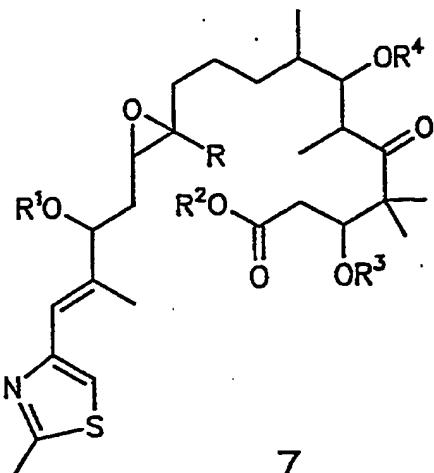
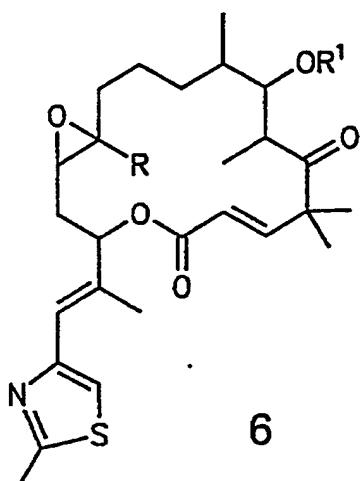
DE 195 42 986 A 1

1
Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein Epothilonederivate und deren Verwendung zur Herstellung von Arzneimitteln. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung die Herstellung der Epothilonederivate der nachfolgend dargestellten allgemeinen Formeln 1 bis 7 sowie deren Verwendung zur Herstellung von therapeutischen Mitteln und Mitteln für den Pflanzenschutz.



60



In den vorstehenden Formeln 1 bis 7 bedeuten:

R = H, C₁- bis C₄-Alkyl;
 R¹, R², R³, R⁴, R⁵ = H, C₁- bis C₆-Alkyl, C₁- bis C₆-Acyl-Benzoyl, C₁- bis C₄-Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C₁- bis C₆-Alkoxy-, C₆-Alkyl-, Hydroxy- und Halogen-substituiertes Benzyl bzw. Phenyl; wobei auch zwei der Reste R¹ bis R⁵ zu der Gruppierung -(CH₂)_n- mit n = 1 bis 6 zusammentreten können und es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um gradkettige oder verzweigte Reste handelt.

In der Formel 1 sind X und Y entweder gleich oder verschieden und stehen jeweils für Halogen, OH, O-(C₁- bis C₆)-Acyl, O-(C₁- bis C₆)-Alkyl, O-Benzoyl.

In der Formel 3 steht X allgemein für -C(O)-, -C(S)-, -S(O)-, -CR¹R²-, wobei R¹ und R² die Bedeutung haben wie oben angegeben, und -SiR₂, wobei R die Bedeutung hat wie oben angegeben.

In der Formel 4 bedeutet X Sauerstoff, NOR³, N-NR⁴R⁵, und N-NHCONR⁴R⁵, wobei die Reste R³ bis R⁵ die oben angegebene Bedeutung haben.

In der Formel 5 bedeutet X Wasserstoff, C₁- bis C₁₈-Alkyl, C₁- bis C₁₈-Acyl, Benzyl, Benzoyl und Cinnamoyl.

Verbindungen gemäß der allgemeinen Formel 1 sind ausgehend von Epothilon A und B sowie von deren 3-O- und/oder 7-O-geschützten Derivaten durch Öffnung des 12,13-Epoxids zugänglich. Werden dazu Hydrogenwas-

serstoffsäuren in einem bevorzugt nicht wäßrigen Lösungsmittel eingesetzt, wobei man die Halogenhydrine X = Hal, Y = OH und Y = OH, Y = Hal erhält. Protonensäuren wie z. B. Toluolsulfonsäure und Tri-
 5 fluoressigsäure führen in Gegenwart von Wasser zu 12,13-Diolen, die anschließend nach Standardverfahren acyliert (z. B. mit Carbonsäureanhydriden und Pyridin oder Triethylamin/DMAP) oder alkyliert (Alkylhalogenide und Silberoxid) werden. Die 3- und 7-Hydroxygruppen können dazu vorübergehend als Formiat (Abspaltung mit NH₃/MeOH) oder p-Methoxybenzylether (Abspaltung mit DDQ) geschützt werden.

Verbindungen gemäß der allgemeinen Formel 2 sind aus Epothilon A und B sowie deren 3-O- und/oder 7-O-geschützten Derivaten durch Reduktion, z. B. mit NaBH₄ in Methanol erhältlich. Sind dabei 3-OH und/oder 7-OH reversibel geschützt, so können nach Acylierung oder Alkylierung und Entfernen der Schutzgruppen 5-O-monosubstituierte, 3,5- oder 5,7-O-disubstituierte Derivate der allgemeinen Formel 2 erhalten werden.

Umsetzungen von Epothilon A und B mit bifunktionalen elektrophilen Reagenzien, wie (Thio)Phosgen, (Thio)Carbonyldimidazol, Thionylchlorid oder Dialkylsilyldichloriden bzw. -bistriflaten ergeben Verbindungen der allgemeinen Formel 3. Als Hilfsbasen dienen dabei Pyridin, Trialkylamine, ggf. zusammen mit DMAP bzw. 2,6-Lutidin in einem nichtprotischen Lösungsmittel. Die 3,7-Acetale der allgemeinen Formel 3 entstehen durch Umacetalisierung z. B. von Dimethylacetalen in Gegenwart eines sauren Katalysators.

Verbindungen gemäß der allgemeinen Formel 4 werden aus Epothilon A und B oder ihren 3-O- und/oder 7-O-geschützten Derivaten durch Ozonolyse und reduktive Aufarbeitung, z. B. mit Dimethylsulfid, erhalten. Die C-16-Ketone können anschließend nach dem Fiehmann geläufigen Standardverfahren in Oxime, Hydrzone oder Semicarbazone umgewandelt werden. Sie werden weiterhin durch Wittig-, Wittig-Horner-, Julia- oder Petersen-Olefinition in C-16/C-17-Olefine überführt.

Durch Reduktion der C-16-Ketogruppe, z. B. mit einem Aluminium- oder Borhydrid, sind die 16-Hydroxyderivate gemäß der allgemeinen Formel 5 erhältlich. Diese können, wenn 3-OH und 7-OH mit entsprechenden Schutzgruppen versehen sind, selektiv acyliert oder alkyliert werden. Die Freisetzung der 3-OH- und 7-OH-Gruppen erfolgt z. B. bei O-Formyl durch NH₃/MeOH, bei O-p-Methoxybenzyl durch DDQ.

Die Verbindungen der allgemeinen Formel 6 werden aus Derivaten von Epothilon A und B erhalten, bei denen die 7-OH-Gruppe durch Acyl- oder Ethergruppen geschützt ist, in dem die 3-OH-Gruppe z. B. formyliert, mesyliert oder tosyliert und anschließend durch Behandlung mit einer Base z. B. DBU eliminiert wird. Die 7-OH-Gruppe kann wie oben beschrieben freigesetzt werden.

Verbindungen der allgemeinen Formel 7 werden aus Epothilon A und B oder deren 3-OH- und 7-OH-geschützten Derivaten durch basische Hydrolyse erhalten, z. B. mit NaOH in MeOH. Die Carboxylgruppe kann mit Diazoalkanen nach Schutz der 19-OH-Gruppe durch Alkylierung in Ester umgewandelt werden.

Die Erfindung betrifft ferner Mittel für den Pflanzenschutz in Landwirtschaft, Forstwirtschaft und/oder Gartenbau, bestehend aus einer oder mehreren der vorstehend aufgeführten Epothilon-derivate bzw. bestehend aus einem oder mehreren der vorstehend aufgeführten

Epothilon-derivate neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

Schließlich betrifft die Erfindung therapeutische Mittel, bestehend aus einer oder mehreren der vorstehend aufgeführten Verbindungen oder einer oder mehreren der vorstehend aufgeführten Verbindungen neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n). Diese Mittel können insbesondere cytotoxische Aktivitäten entwickeln und/oder Immunsuppression bewirken, so daß sie besonders bevorzugt als Cytostatika verwendbar sind.

Die Erfindung wird im folgenden durch die Beschreibung von einigen ausgewählten Ausführungsbeispielen näher erläutert und beschrieben.

gung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol, 90 : 10).

Ausbeute: 19 mg (32%)

Rf (Dichlormethan/Methanol, 90 : 10): 0.46.

IR (Film): ν = 3441 (s, br, Sch), 2948 (s, Sch), 1725 (vs, Sch), 1462 (m), 1381 (w), 1265 (m), 1154 (w), 972 (m, br, Sch) cm^{-1} .

10 UV (Methanol): λ_{max} ($\lg E$) = 210 (4.29), 248 (4.11) nm.

MS (20/70 ev): m/e (%) = 529 (13 [M⁺]), 494 (10), 342 (38), 306 (23), 194 (32), 164 (100), 140 (31), 113 (15), 57 (16).

Hochauflösung: $C_{26}H_{39}O_6NS$

ber.: 529.2265 für [M⁺]

gef.: 529.2280

Beispiele

Verbindung 1a

20 mg (0.041 mmol) Epothilon A werden in 1 ml Aceton gelöst, mit 50 μl (0.649 mmol) Trifluoressigsäure versetzt und über Nacht bei 50°C gerührt zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schicht-chromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 85 : 15).

Ausbeute: 4 mg (19%) Isomer I; 4 mg (19%) Isomer II

Isomer I:

Rf (Dichlormethan/Aceton, 85 : 15): 0.46

IR (Film): ν = 3440 (m, b, Sch), 2946 (s, gch), 1734 (vs), 1686 (m), 1456 (m), 1375 (w), 1256 (s, Sch), 1190 (w, b, Sch), 1071 (m, Sch), 884 (w), 735 (w) cm^{-1} .

MS (20/70 ev): m/e (%) = 493 (43 [M-H₂O]⁺), 394 (47), 306 (32), 206 (30), 181 (40), 166 (72), 139 (100), 113 (19), 71 (19), 57 (24), 43 (24).

Hochauflösung: $C_{26}H_{39}O_6NS$

ber.: 493.2498 für [M-H₂O]⁺

gef.: 493.2478

25 mg (0.047 mmol) 12-Chlor-13-hydroxy-epothilon A (1b) werden in 1 ml Dichlormethan gelöst, mit 29 mg (0.235 mmol) Dimethylaminopyridin, 151 μl (1.081 mmol) Triethylamin und 20 μl (0.517 mmol) 98%iger Ameisensäure versetzt. Das Reaktionsgemisch wird mit Eis/Natriumchlorid abgekühlt. Nach Erreichen von -15°C werden dem Reaktionsgemisch 40 μl (0.423 mmol) Essigsäureanhydrid zugegeben und 70 Minuten bei -15°C gerührt. Nach dem ein Dünnschichtchromatogramm keinen vollständigen Umsatz anzeigt,

25 werden dem Reaktionsgemisch weitere 6 mg (0.047 mmol) Di-methylaminopyridin, 7 μl (0.047 mmol) Triethylamin, 2 μl 98%ige Ameisensäure (0.047 mmol) und 4 μl (0.047 mmol) Essigsäureanhydrid zugesetzt und 60 Minuten gerührt.

Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch auf

35 Raumtemperatur erwärmt, mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit.

Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 90 : 10).

Ausbeute 1c: 5 mg (18%).

Verbindung 1c

Rf (Dichlormethan/Aceton 90 : 10): 0.67.

IR (Film): ν = 3497 (w, b, Sch), 2940 (s, b, Sch), 1725 (vs), 1468 (m, b, Sch), 1379 (m), 1265 (s), 1253 (s), 1175 (vs), 972 (m, b, Sch), 737 (s) cm^{-1} .

MS (20/70 ev): m/e (%) = 613 (9 [M⁺]), 567 (43), 472 (63), 382 (23), 352 (21), 164 (100), 151 (33), 96 (31), 69 (17), 44 (26).

55 Hochauflösung: $C_{26}H_{40}O_9NSCl$

ber.: 613.2112 für [M⁺]

gef.: 613.2131

Verbindung 1b

55 mg (0.111 mmol) Epothilon A werden in 0.5 ml Tetrahydrofuran gelöst, mit 0.5 ml 1 N Salzsäure versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit 1 N Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reini-

65 10 mg (0.020 mmol) Epothilon 3 werden in 0.5 ml Tetrahydrofuran gelöst, mit 0.5 ml 1 N Salzsäure versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reini-

Verbindung 1d

gung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schicht-chromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 85 : 15).

Ausbeute: 1 mg (9%).

Rf (Dichlormethan/Aceton 85 : 15): 0.38.

MS (20/70 ev): m/e (%) = 543 (3 [M⁺]), 507 (14), 320 (19), 234 (9), 194 (17), 182 (23), 164 (100), 140 (22), 113 (14), 71 (13).

Hochauflösung: C₂₆H₄₂O₆NSCl

ber.: 543.2421 für [M⁺]

gef.: 543.2405

Verbindung 2a

100 mg (0.203 mmol) Epothilon A werden in 4 ml Tetrahydrofuran/1 M Phosphatpuffer pH 7 (1 : 1) gelöst und solange mit Natrium-borhydrid (150 mg 3.965 mmol) versetzt bis das Edukt laut Dünnschicht-chromatogramm vollständig abreaktiert ist. Anschließend wird mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 verdünnt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit.

Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt durch Kieselchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 95 : 5 – grad – nach Dichlormethan/Aceton, 85 : 15).

Ausbeute: (20%).

Rf (Dichlormethan/Aceton 75 : 25): 0.27.

IR (Film): ν = 3413 (s, b, Sch), 2965 (vs, Sch), 1734 (vs), 1458 (m, b, Sch), 1383 (m, Sch), 1264 (s, b, Sch), 1184 (m, b, Sch), 1059 (s, Sch), 966 (s), 885 (w), 737 (m) cm⁻¹.

MS (20/70 ev): m/e (%) = 495 (6 [M⁺]), 477 (8), 452 (12), 394 (9), 364 (16), 306 (49), 194 (19), 178 (35), 164 (100), 140 (40), 83 (21), 55 (27).

Hochauflösung: C₂₆H₄₄O₆NS

ber.: 495.2655 für [M⁺]

gef.: 495.2623

Verbindung 3a–d (a–d sind Stereoisomere)

100 mg (0.203 mmol) Epothilon werden in 3 ml Pyridin gelöst, mit 50 μ (0.686 mmol) Thionylchlorid versetzt und 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wäßrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes und Trennung der vier Stereoisomeren 3a–d erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Toluol/Methanol, 90 : 10).

Verbindung 3a

Ausbeute: 4 mg (12%).

Rf (Toluol/Methanol 90 : 10): 0.50.

IR (Film): ν = 2961 (m, b, Sch), 1742 (vs), 1701 (vs), 1465 (m, Sch), 1389 (m, Sch), 1238 (s, Sch), 1210 (vs, Sch), 1011 (s, Sch), 957 (s, b, Sch), 808 (m, Sch), 768 (s, Sch) cm⁻¹.

Uv (Methanol): λ_{max} (lg ε) = 210 (4.50), 248 (4.35) nm.

MS (20/70 ev): m/e (%) = 539 (40 [M⁺]), 457 (22), 362 (16), 316 (27), 222 (30), 178 (30), 164 (100), 151 (43), 96 (38), 69 (29), 55 (28), 43 (20).

⁵ Hochauflösung: C₂₆H₄₃O₇NS₂
ber.: 539.2011 für [M⁺]

Verbindung 3b

Ausbeute: 14 mg (13%).

Rf (Toluol/Methanol 90 : 10): 0.44.

IR (Film): ν = 2963 (s, br, Sch), 1740 (vs), 1703 (s), 1510 (w), 1464 (m, br, Sch), 1389 (m, Sch), 1240 (s, br, Sch), 1142 (m), 1076 (w), 1037 (w), 1003 (m), 945 (s, br, Sch), 806 (m, Sch), 775 (s), 737 (m) cm⁻¹.

Uv (Methanol): λ_{max} (lg ε) = 211 (4.16), 250 (4.08) nm.
MS (20/70 ev): m/e (%) = 539 (27 [M⁺]), 475 (17), 322 (41), 306 (67), 222 (16), 206 (17), 194 (19), 178 (32), 164 (100), 151 (33), 125 (18), 113 (15), 96 (39), 81 (23), 64 (58), 57 (42), 41 (19).

Hochauflösung: C₂₆H₄₃O₇NS₂
ber.: 539.2011 für [M⁺]
gef.: 539.1998

Verbindung 3c

Ausbeute: 4 mg (4%).

Rf (Toluol/Methanol 90 : 10): 0.38.

MS (20/70 ev): m/e (%) = 539 (51 [M⁺]), 322 (22), 306 (53), 222 (36), 178 (31), 164 (100), 151 (41), 96 (25), 81 (20), 69 (26), 55 (25), 41 (25).

Hochauflösung: C₂₆H₄₃O₇NS₂
ber.: 539.2011 für [M⁺]
gef.: 539.2001

Verbindung 3d

Ausbeute: 1 mg (1%).

Rf (Toluol/Methanol 90 : 10): 0.33.

MS (20/70 ev): m/e (%) = 539 (69 [M⁺]), 322 (35), 306 (51), 222 (41), 178 (31), 164 (100), 151 (46), 96 (31), 81 (26), 69 (34), 55 (33), 41 (35).

Hochauflösung: C₂₆H₄₃O₇NS₂
ber.: 539.2011 für [M⁺]
gef.: 539.1997

Verbindung 4a

10 mg (0.020 mmol) Epothilon A werden in 2 ml Dichlormethan gelöst, auf -70°C abgekühlt und anschließend 5 Minuten mit Ozon bis zur schwachen Blaufärbung behandelt. Das resultierende Reaktionsgemisch wird anschließend mit 0.5 ml Dimethylsulfid versetzt und auf Raumtemperatur erwärmt. Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch vom Lösungsmittel befreit und schließlich durch präparative Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton/Methanol, 85 : 10 : 5) gereinigt.
⁶⁰ Ausbeute: 5 mg (64%).

Rf (Dichlormethan/Aceton/Methanol 85 : 10 : 5): 0.61.

IR (Film): ν = 3468 (s, br, Sch), 2947 (s, br, Sch), 1734 (vs, Sch), 1458 (w), 1380 (w), 1267 (w), 1157 (w), 1080 (w), 982 (w) cm⁻¹.

Uv (Methanol): λ_{max} (lg ε) = 202 (3.53) um.

MS (20/70 ev): m/e (%) = 398 (2 [M⁺]), 380 (4), 267 (14),

9

249 (17), 211 (20), 193 (26), 171 (34), 139 (34), 111 (40), 96 (100), 71 (48), 43 (50).
 Hochauflösung: $C_{21}H_{34}O$,
 ber.: 398.2305 für $[M^+]$
 gef.: 398.2295

10

164 (100), 151 (34), 139 (28), 113 (20), 96 (82), 81 (33), 67 (24), 55 (26), 43 (22).
 Hochauflösung: $C_{27}H_{37}O_6NS$
 ber.: 503.2342 für $[M^+]$
 gef.: 503.2303

Verbindung 6a

10 mg (0.018 mmol) 3,7-Di-O-formyl-epothilon A werden in 1 ml Di-chlormethan gelöst, mit 27 μ l (0.180 mmol) 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) versetzt und 60 Minuten bei Raumtemperatur gerührt.

Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch mit 1 M Natriumdihydrogenphosphat-Puffer pH 4.5 versetzt und die wässrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit.

Nach Beseitigung des Lösungsmittel wird das resultierende Rohprodukt in 1 ml Methanol gelöst, mit 200 μ l einer ammoniakalischen Methanolösung (2 mmol NH₃/ml Methanol) versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 4 mg (22%).

Rf (Dichlormethan/Aceton 85 : 15): 0.46.

IR (Film): ν = 3445 (w, br, Sch), 2950 (vs, br, Sch), 1717 (vs, Sch), 1644 (w), 1466 (m, Sch), 1370 (m, Sch), 1267 (s, br, Sch), 1179 (s, Sch), 984 (s, Sch), 860 (w), 733 (m) cm⁻¹.
 Uv (Methanol): λ_{max} (lg ϵ) = 210 (4.16) nm.

MS (20/70 ev): m/e (%) = 475 (28 [M $^+$]), 380 (21), 322 (37), 318 (40), 304 (66), 178 (31), 166 (100), 151 (29), 140 (19), 96 (38), 81 (20), 57 (26).

Hochauflösung: $C_{26}H_{37}O_5NS$
 ber.: 475.2392 für $[M^+]$
 gef.: 475.2384

Verbindung 6b

50 mg (0.091 mmol) 3,7-Di-O-formyl-epothilon A (werden in 1 ml Dichlorethan gelöst, mit 2 ml (0.013 mol) 1,8-Diazabicyclo-[5.4.0]undec-7-en (DBU) versetzt und 12 Stunden bei 90°C gerührt.

Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch mit 1 M Natriumdihydrogenphosphat-Puffer pH 4.5 versetzt und die wässrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit.

Die Reinigung des aus zwei Verbindungen bestehenden Rohproduktes erfolgt mittels präparativer Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Aceton, 90:10).

Ausbeute: 7 mg (15%).

Substanzcode

60

Rf (Dichlormethan/Aceton 90 : 10): 0.62.

IR (Film): ν = 2951 (m, br, Sch), 1723 (vs), 1644 (w, br, Sch), 1468 (w), 1377 (w), 1271 (m, br, Sch), 1179 (s), 987 (m, br, Sch), 735 (w, br, Sch) cm⁻¹.

Uv (Methanol): λ_{max} (lg ϵ) = 210 (4.44) nm.

MS (20/70 ev): m/e (%) = 503 (68 [M $^+$]), 408 (58), 390 (32), 334 (25), 316 (34), 220 (21), 206 (27), 194 (20), 181 (33),

Verbindung 6c

5 mg (0.009 mmol) 3,7-Di-O-acetyl-epothilon werden in 1 ml Methanol gelöst, mit 150 μ l einer ammoniakalischen Methanolösung (2 mmol NH₃/ml Methanol) versetzt und über Nacht bei 50°C gerührt.

Zur Aufarbeitung wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Toluol/Methanol, 90 : 10).

Ausbeute: 3 mg (67%).

20 Rf (Dichlormethan/Aceton 90 : 10): 0.55.
 IR (Film): ν = 2934 (s, b, Sch), 1719 (vs, b, Sch), 1641 (m), 1460 (m, Sch), 1372 (s, Sch), 1237 (vs, b, Sch), 1179 (s, Sch), 1020 (s), 963 (s, Sch), 737 (vs) cm⁻¹.

Uv (Methanol): λ_{max} (lg ϵ) = 210 (4.33) nm.

25 MS (20/70 ev): m/e (%) = 517 (57 [M $^+$]), 422 (58), 318 (31), 194 (20), 181 (34), 166 (100), 151 (31), 96 (96), 81 (32), 69 (27), 55 (29), 43 (69).

Hochauflösung: $C_{28}H_{39}O_6NS$

ber.: 517.2498 für $[M^+]$
 gef.: 517.2492

Verbindung 7a

20 mg (0.041 mmol) Epothilon werden in 0.5 ml Methanol gelöst, mit 0.5 ml 1 N Natronlauge versetzt und 5 Minuten bei Raumtemperatur gerührt.

Zur Aufarbeitung wird das Reaktionsgemisch mit 1 M Phosphatpuffer pH 7 versetzt und die wässrige Phase viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Dichlormethan/Methanol, 85 : 15).

Ausbeute: 11 mg (52%).

Rf (Dichlormethan/Methanol 85 : 15): 0.92.

50 IR (Film): ν = 3438 (s, br, Sch), 2971 (vs, br, Sch), 1703 (vs), 1507 (m), 1460 (s, Sch), 1383 (m, Sch), 1254 (w), 1190 (w, br, Sch), 1011 (w, br, Sch), 866 (w, br), 729 (s) cm⁻¹.

MS (20/70 ev): m/e (%) = 423 (0.1 [M $^+$]), 323 (4), 168 (89), 140 (100), 85 (31), 57 (67).

55 Hochauflösung: $C_{23}H_{37}O_4NS$

ber.: 423.2443 für $[M^+]$
 gef.: 423.2410

Verbindung 7b

5 mg (0.009 mmol) 7-O-Acetyl-epothilon werden in 1 ml Methanol gelöst, mit 200 μ l einer ammoniakalischen Methanolösung (2 mmol NH₃/ml Methanol) versetzt und zwei Tage bei 50°C gerührt. Zur Aufarbeitung wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie (Laufmittel: Toluol/Methanol, 90 : 10).

Ausbeute: 3 mg (59%).

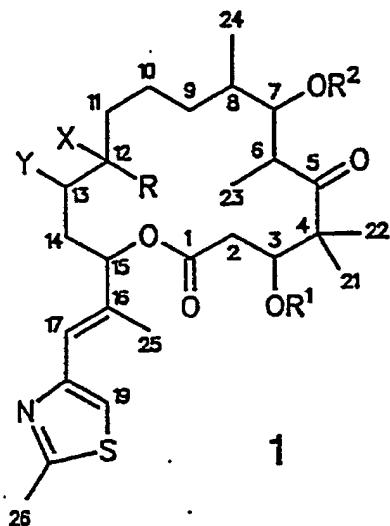
Rf (Dichlormethan/Methanol 90 : 10): 0.63.
IR (Film): ν = 3441 (m, b, Sch), 2946 (s, Sch), 1732 (vs),
1600 (w), 1451 (m), 1375 (m), 1246 (s, b, Sch), 1013 (m, b,
Sch) cm^{-1} .

UV (Methanol): λ_{max} (lg ϵ) = 211 (3.75), 247 (3.59) nm.
MS (20/70 ev): m/e (%) = 567 (1 [M $^+$]), 465 (4), 422 (7),
388 (5), 194 (5), 182 (7), 168 (65), 164 (17), 140 (100), 97
(10), 71 (22), 43 (27).

Hochauflösung: C₂₉H₄₅O₈NS
ber.: 567.2866 für [M $^+$]
gef.: 567.2849

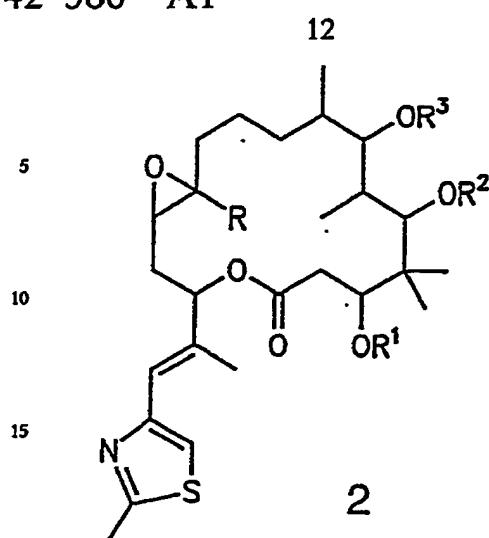
Patentansprüche

1. Epothilonederivat der Formel 1



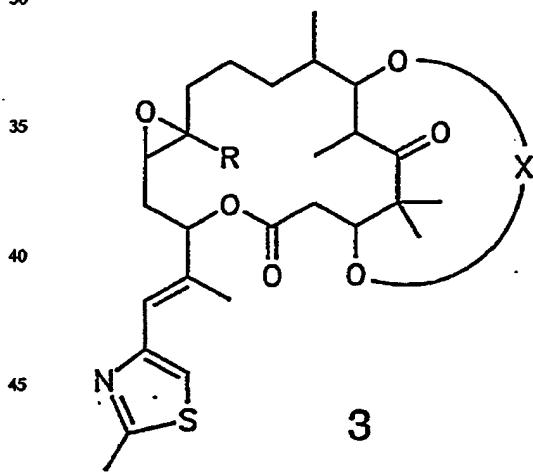
wobei R = H, C₁- bis C₄-Alkyl; R¹, R² = H, C₁- bis C₆-Alkyl, C₁- bis C₆-Acyl-Benzoyl, C₁- bis C₄-Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C₁- bis C₆-Alkoxy-, C₆-Alkyl-, Hydroxy- und Halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; und es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um geradkettige oder verzweigte Reste handelt, und X und Y entweder gleich oder verschieden sind und jeweils für Halogen, OH, O-(C₁- bis C₆)-Acyl, O-(C₁- bis C₆)-Alkyl, O-Benzoyl stehen.

2. Epothilonederivat der Formel 2



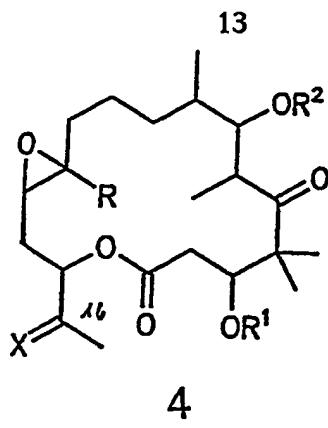
wobei R = H, C₁- bis C₄-Alkyl; R¹, R², R³ = H, C₁- bis C₆-Alkyl, C₁- bis C₆-Acyl-Benzoyl, C₁- bis C₄-Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C₁- bis C₆-Alkoxy-, C₆-Alkyl-, Hydroxy- und Halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; und es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um geradkettige oder verzweigte Reste handelt.

3. Epothilonederivat der Formel 3



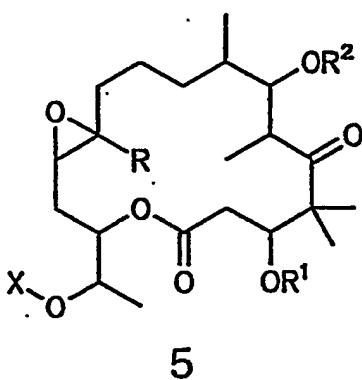
wobei R = H, C₁- bis C₄-Alkyl; R¹, R² = H, C₁- bis C₆-Alkyl, C₁- bis C₆-Acyl-Benzoyl, C₁- bis C₄-Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C₁- bis C₆-Alkoxy-, C₆-Alkyl-, Hydroxy- und Halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; und es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um geradkettige oder verzweigte Reste handelt, und X allgemein für -C(O)-, -C(S)-, -S(O)-, -CR¹R²- und -SiR₂- steht, wobei R, R¹ und R² die Bedeutung hat wie oben angegeben.

4. Epothilonederivat der Formel 4



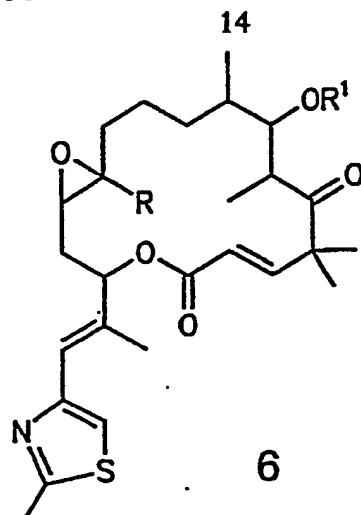
wobei R = H, C₁- bis C₄-Alkyl; R¹, R² = H, C₁- bis C₆-Alkyl, C₁- bis C₆-Acyl-Benzoyl, C₁- bis C₄-Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C₁- bis C₆-Alkoxy-, C₆-Alkyl-, Hydroxy- und Halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; und es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um geradketige oder verzweigte Reste handelt, X Sauerstoff, NOR³, N—NR⁴R⁵, und N—NHCONR⁴R⁵ bedeuten, wobei die Reste R³ bis R⁵ die oben angegebene Bedeutung haben.

5. Epothilonederivat der Formel 5



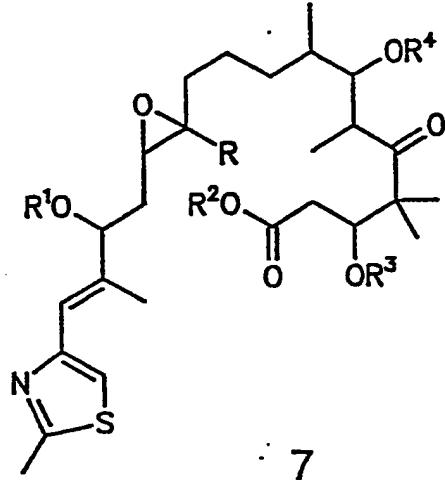
wobei R = H, C₁- bis C₄-Alkyl; R¹, R² = H, C₁- bis C₆-Alkyl, C₁- bis C₆-Acyl-Benzoyl, C₁- bis C₄-Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C₁- bis C₆-Alkoxy-, C₆-Alkyl-, Hydroxy- und Halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; und es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um geradketige oder verzweigte Reste handelt, und X Wasserstoff, C₁- bis C₁₈-Alkyl, C₁- bis C₁₈-Acyl, Benzyl, Benzoyl und Cinnamoyl bedeutet.

6. Epothilonederivat der Formel 6



wobei R = H, C₁- bis C₄-Alkyl und R¹ = H, C₁- bis C₆-Alkyl, C₁- bis C₆-Acyl-Benzoyl, C₁- bis C₄-Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C₁- bis C₆-Alkoxy-, C₆-Alkyl-, Hydroxy- und Halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl ist, und es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um geradketige oder verzweigte Reste handelt.

7. Epothilonederivat der Formel 7



wobei R = H, C₁- bis C₄-Alkyl und R¹, R² = H, C₁- bis C₆-Alkyl, C₁- bis C₆-Acyl-Benzoyl, C₁- bis C₄-Trialkylsilyl, Benzyl, Phenyl, C₁- bis C₆-Alkoxy-, C₆-Alkyl-, Hydroxy- und Halogensubstituiertes Benzyl bzw. Phenyl; und es sich bei den in den Resten enthaltenen Alkyl- bzw. Acylgruppen um geradketige oder verzweigte Reste handelt.

8. Mittel für den Pflanzenschutz in der Landwirtschaft und Forstwirtschaft und/oder im Gartenbau, bestehend aus einem oder mehreren der Verbindungen gemäß einem der vorangehenden Ansprüche oder einer oder mehreren dieser Verbindungen neben einem oder mehreren üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel(n).

9. Therapeutisches Mittel, insbesondere zum Einsatz als Cytostatikum, bestehend aus einer oder mehrerer der Verbindungen nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7 oder einer oder mehreren

rer der Verbindungen nach einem oder mehreren
der Ansprüche 1 bis 7 neben einem oder mehreren
üblichen Träger(n) und/oder Verdünnungsmittel
(n).

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -

German Language Consulting and Services

104 E 40th St / Suite 505
New York NY 10016-1801 / USA
TEL & FAX: (212) 986-6477

3 February 1999

CERTIFICATE OF TRANSLATOR

I certify that I have made the translation of the
German patent number DE 195 42 986 A1
to the best of my knowledge and ability, and that it is a
complete and accurate rendering of the original German document.

Edward G Fichtner
Edward G Fichtner PhD / Owner

STATE OF NEW YORK)
) ss.
COUNTY OF New York)

On this 3 day of February 1999, there appeared
before me Edward G Fichtner, known to me to be the person of that
name, who duly acknowledged to me that he had executed the
foregoing certificate.

Roy Gilomer
Notary Public

ROY GILOMER
Notary Public, State of New York
No. 01614803923
Qualified in Kings County
Commission Expires June 30, 2000

{page 1}

(19) FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY

GERMAN PATENT OFFICE

(51) International Class: C 07 D 493/08

C07 D 493/18; C07 D 417/06;
C07 D 497/08; C07 F 7/07;
A01 N 43/90; C07 F 8/685; A51 K 31/425

(12) Disclosure Document

(10) DE 195 42 986 A1

(21) Document symbol: 195 42 986.9

(22) Day of application: 17 Nov 1995

(43) Day of disclosure: 22 May 1997

// (C07D 493/08,303:00,315:00) (C07D 493/18,303:00,315:00,321:00)
(C07D 497/08,303:00,315:00,327:00) (C07D 417/06,277:24,303:12)
(C07D 417/06,277:24,315:00)

(71) Applicant: Gesellschaft für
biotechnologische Forschung
mbH (GBF), 38124 Braunschweig,
Germany

(74) Representative Patent Attorneys Dr Boeters,
Bauer, Dr Meyer, 81541 Munich

(72) Inventor: Prof Dr Gerhard Höfle, 38124
Braunschweig, Germany; Dr
Michael Kiffe, 38124
Braunschweig, Germany

(54) Epothilon derivates and their application

(57) The present invention deals with epothilon derivates
and their application

The following information is taken from documents submitted by
the applicant.

{page 2, column 1}

Description

The present invention generally deals with epothilon derivates and their use for the manufacture of medicines. In particular, the present invention deals with the manufacture of epothilon derivates of general formulas 1 through 7 presented below as well as their use for the manufacture of therapeutic agents and agents for the protection of plants.

{formulas 1 and 2}

{page 2, column 2}

{formulas 3, 4, and 5}

{page 3, column 3}

{formulas 6 and 7}

In formulas 1 through 7 above, the abbreviations indicated have the following meanings:

R = H, C₁- to C₄-alkyl;

R¹, R², R³, R⁴, R⁵ = H₂C₁- to C₆-alkyl, C₁- to C₆-acyl-benzoyl, C₁- to C₄-trialkylsilyl, benzyl, phenyl, C₁- to C₆-alkoxy-, C₆-alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl or phenyl;

in which case, two of the residues R¹ to R⁵ can come together into the grouping --(CH₂)_n-- with n = 1 to 6, when, in connection with the alkyl or acyl groups contained in the residues, it involves straight-chained or branched residues.

In formula 1, X and Y are either equal or different, and stand in the respective case for halogen, OH, O--(C₁- to C₆)-acyl, O--(C₁- to C₆)-alkyl, O-benzoyl.

In formula 3, X generally stands for --C(O)--, --C(S)--,

--S(O)--, --CR¹R²--, in which case R¹ and R² have the meaning given above, and --SiR₂, in which case R has the meaning given above.

In formula 4, X means oxygen, NOR³, N--NR⁴R⁵, and N--NHCONR⁴R⁵, in which case the residues R³ to R⁵ have the meaning given above.

In formula 5, X means hydrogen, C₁- to C₁₂-alkyl, C₁- to C₁₆-acyl, benzyl, benzoyl, and cinnamoyl.

Compounds on the pattern of general formula 1 are, starting from epothilon A and B as well as from their 3-O- and/or 7-O-protected derivates, accessible by opening of the 12,13-epoxide. If hydrogen acids {page 3, column 4} are introduced into a preferably non-aqueous solution, in which connection one gets the halogen hydrines X = Hal, Y = OH, and Y = OH, Y = Hal. Proton acids like, e.g., toluol sulfon acid and trifluor acetic acid lead, in the presence of water, to 12,13-dioles, which are subsequently acylated (e.g., with carboxylic acid hydrides and pyridine or triethylamine/DMAP) or alkylated (alkyl halogenide and silver oxide) according to standard procedures. The 3- and 7-hydroxy-groups can be protected against this temporarily as formate (separation with NH₃ / MeOH) or p-methoxybenzylether (separation with DDQ).

Compounds on the pattern of general formula 2 can be derived from epothilon A and B, as well as from their 3-O- and or 7-O-protected derivates by reduction, e.g, with NaBH₄ in methanol. If in this process 3-OH and/or 7-OH are reversibly protected, then,

after acylation or alkylation and removal of the protective groups, 5-O-monosubstituted, 3,5- or 5,7-O-disubstituted derivates of general formula 2 are obtained.

Transformations of epothilon A and B with bifunctional elektrophile reagents like (thio)phosgene, (thio)carbonyldimidazol, thionyl chloride, or dialkylsilyl dichlorides or bistriflates produce compounds of general formula 3. Pyridine, trialkylamine, in some cases together with DMAP or 2,6-lutidin in an aprotic solution, serve as auxiliary bases. The 3,7-acetals of general formula 3 arise through re-acetylation, e.g., of the dimethylacetals in the presence of an acid catalyst.

Compounds in the pattern of general formula 4 are derived from epothilon A and B or their 3-O- and/or 7-O-protected derivates by ozonolysis and reductive treatment, e.g., with dimethyl sulfide. The C-16-ketones can subsequently be transformed by the standard processes with which the professional is familiar into oximes, hydrazones, or semicarbazones. They can be further changed into C-16/C-17-olefins by Wittig, Wittig-Horner, Julia, or Petersen olefination.

By reduction with the C-16-ketone group, e.g., with an aluminum or boron hydride, the 16-hydroxy derivates can be obtained on the pattern of general formula 5. These can be selectively acylated or alkylated if 3-OH and 7-OH are provided with the appropriate protective groups. The release of the 3-OH and 7-OH groups takes place -- e.g., in connection with O-formyl through NH₃/MeOH, in connection with O-p-methoxybenzyl through

DDQ.

The compounds of general formula 6 are obtained from derivates of epitholon A and B, in connection with which the 7-OH-group is protected by acyl or ether groups, while the 3-OH group is, e.g., formylated, mesylated, or tosylated, and is subsequently eliminated through treatment with a base, e.g., DBU. The 7-OH-group can be set free as described above.

Compounds of general formula 7 are derived from epothilon A and B or their 3-OH and 7-OH-protected derivates by alkaline hydrolysis, e.g., with NaOH in MeOH. The carboxyl group can be transformed into esters with diazo-alkanes after protection of the 19-OH group by alkylation.

The invention is further applicable to the protection of plants in agriculture, forestry, or gardening, as it consists of one or several of the above-listed epothilon derivates, or of one or several of the above-listed {page 4, column 5} epothilon derivates in conjunction with one or several of the usual carrier(s) or dilutant(s).

Finally, the invention is applicable to therapeutic substances, as it consists of one or several of the above-listed compounds, or of one or several of the above-listed compounds in conjunction with one or several of the usual carrier(s) or dilutant(s). These substances can, in particular, produce cytotoxic activities and/or effect immune suppression, with the result that they are by especial preference used as cytostatics.

The invention will be further explained and described below

by the description of several selected examples of execution.

Examples

Compound 1a

20 mg (0.041 mmol) of epothilon A are dissolved in 1 ml of acetone, mixed with 50 μ l (0.649 mmol) of trifluor acetic acid, and stirred overnight at 50° C. To complete the process, the reaction mixture is mixed with 1 M phosphate buffer of pH 7 and the aqueous phase extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with a saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate, and freed from the solvent. The purification of the raw product takes place with the help of preparative thin-layer chromatography (solvent: dichlormethane / acetone, 85:15).

Yield: 4 mg (19%) Isomer I; 4 mg (19%) Isomer II.

Isomer I:

Rf [retention factor] (dichlormethane / acetone, 85:15): 0.46.

IR [infra-red] (Film): ν = 3440 (m, b, Sch), 2946 (c, gch), 1734 (vs), 1686 (m), 1456 (m), 1375 (w), 1256 (s, Sch), 1190 (w, b, Sch), 1071 (m, Sch), 884 (w), 785 (w) cm^{-1} .

MS [mass spectrometry] (20/70 ev): m/e (%) = 493 (43 [M--H₂O]⁺), 354 (47), 306 (32), 206 (30), 181 (40), 166 (72), 139 (100), 113 (19), 71 (19), 57 (24), 43 (24).

High resolution: C₂₆H₃₃O₅NS

calculated: 493.2498 for $[M-H_2O]^+$

found: 493.2478

Isomer II:

Rf (dichlormethane / acetone, 85:15): 0.22.

IR (Film): ν = 3484 (s, b, Sch), 2942 (vs, Sch), 1727 (vs), 1570 (w), 1456 (m), 1380 (m), 1265 (s), 1190 (w), 1069 (m), 975 (w), cm^{-1} .

MS (20/70 ev): m/e (%) = 493 (21 $[M-H_2O]^+$), 394 (12), 306 (46), 205 (37), 181 (63), 166 (99), 139 (100), 113 (21), 71 (23), 57 (33), 43 (28).

High resolution: $C_{26}H_{39}O_8NS$

calculated: 493.2498 for $[M-H_2O]^+$

found: 493.2475

Compound 1b

55 mg (0.111 mmol) of epothilon A are dissolved in 0.5 ml of tetrahydrofuran, mixed with 0.5 ml of 1 N hydrochloric acid, and stirred for 30 minutes at room temperature. This is subsequently mixed with 1 N phosphate buffer of pH7, and the aqueous phase extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with a saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate, and freed from the solvent. The purification {page 4, column 6} of the raw product takes place with the help of preparative thin-layer chromatography (solvent: dichlormethane / acetone, 90:10).

Yield: 19 mg (32%)

Rf (dichlormethane / methanol, 90:10): 0.46.

IR (Film): ν = 3441 (s, br, Sch), 2948 (s, Sch), 1725 (vs, Sch), 1462 (m), 1381 (w), 1265 (m), 1154 (w), 972 (m, br, Sch) cm^{-1} .

Uv [ultra-violet] (Methanol): λ_{max} ($\lg \epsilon$) == 210 (4.29), 248 (4.11) nm.

MS (20/70 ev): m/e (%) = 529 (13 [M⁺]), 494 (10), 342 (38), 306 (23), 194 (32), 164 (100), 140 (31), 113 (15), 57 (16).

High resolution: $C_{26}H_{40}O_6ClNS$

calculated: 529.2255 for [M⁺]

found: 529.2250

Compound 1c

25 mg (0.047 mmol) of 12-chlor-13-hydroxy-epothilon A (1b) are dissolved in 1 ml of dichlormethane, mixed with 29 mg (0.235 mmol) of dimethylaminopyridine, 151 μl (1.081 mmol) of triethylamine, and 20 μl (0.517 mmol) of 98% formic acid. The reaction mixture is cooled with ice and sodium chloride. After reaching a temperature of -15° C., 40 μl (0.423 mmol) of acetic acid anhydride are added to the reaction mixture and stirred for 70 minutes at -15° C. After a thin-layer chromatogram shows no complete conversion, 6 mg (0.047 mmol) of dimethylaminopyridine, 7 μl (0.047 mmol) of triethylamine, 2 μl of 98% formic acid (0.047 mmol), and 4 μ (0.047 mmol) of acetic acid anhydride are added to the reaction mixture, which is then stirred for 60

minutes.

To complete the process, the reaction mixture is warmed to room temperature, mixed with 1 M phosphate buffer of pH7, and the aqueous phase extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with a saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate, and freed from the solvent.

The purification of the raw product takes place with the help of preparative thin-layer chromatography (solvent: dichlormethane / acetone 90:10).

Yield 1c: 5 mg (18%)

Compound 1c

Rf (dichlormethane / acetone, 90:10): 0.67.

IR (Film): ν = 3497 (w, b, Sch), 2940 (s, b, Sch), 1725 (vs), 1468 (m, b, Sch), 1379 (m), 1265 (s), 1253 (s), 1175 (vs), 972 (m, b, Sch), 737 (s) cm^{-1} .

MS (20/70 ev): m/e (%) = 613 (9 [M⁺]), 567 (43), 472 (63), 382 (23), 352 (21), 164 (100), 151 (33), 96 (31), 69 (17), 44 (26).

High resolution: $C_{29}H_{40}O_9NSCl$

calculated: 613.2112 for [M⁺]

found: 613.2131

Compound 1d

10 mg (0.020 mmol) of epothilon B are dissolved in 0.5 ml of tetrahydrofuran, mixed with 0.5 ml of 1 N hydrochloric acid, and stirred for 30 minutes at room temperature. This is subsequently

mixed with 1 N phosphate buffer of pH7, and the aqueous phase extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with a saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate, and freed from the solvent. The purification {page 5, column 7} of the raw product takes place with the help of preparative thin-layer chromatography (solvent: dichlormethane / acetone, 85:15).

Yield: 1 mg (9%)

Rf (dichlormethane / acetone, 85:15): 0.38.

MS (20/70 ev): m/e (%) = 543 (3 [M⁺]), 507 (14), 320 (19), 234 (9), 194 (17), 182 (23), 164 (100), 140 (22), 113 (14), 71 (13).

High resolution: C₂H₄₂O₆NSCl

calculated: 543.2421 for [M⁺]

found: 543.2405

Compound 2a

100 mg (0.203 mmol) of epothilon A are dissolved in 4 ml of tetrahydrofuran / 1 M phosphate buffer of pH7 (1:1), and then mixed with sodium hydroboron (150 mg 3.965 mmol) until the educt, on the basis of a thin-layer chromatogram, has completed reacted. This is subsequently diluted with 1 M phosphate buffer of pH7 and the aqueous phase extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with a saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate, and freed from the solvent.

The purification of the raw product takes place by means of gel chromatography (solvent: dichlormethane / acetone 95:5 -- IMMEDIATELY -- after dichlormethane / acetone, 85:15). {meaning of this passage uncertain}

Yield: (20%)

Rf (dichlormethane / acetone, 75:25): 0.27.

IR (Film): ν = 3413 (s, b, Sch), 2965 (vs, Sch), 1734 (vs), 1458 (m, b, Sch), 1383 (m, Sch), 1264 (s, b, Sch), 1184 (m, b, Sch), 1059 (s, Sch), 966 (s), 885 (w), 737 (m) cm^{-1} .
MS (20/70 ev): m/e (%) = 495 (6 [M⁺]), 477 (8), 452 (12), 394 (9), 364 (16), 306 (49), 194 (19), 178 (35), 164 (100), 140 (40), 83 (21), 55 (27).

High resolution: $C_{28}H_{41}O_6NS$

calculated: 495.2655 for [M⁺]

found: 195.2623

Compound 3a-d (a-d are stereoisomers)

100 mg (0.203 mmol) of epothilon are dissolved in 3 ml of pyridine, mixed with 50 μ (0.686 mmol) of thionyl chloride, and stirred for 15 minutes at room temperature. This is subsequently mixed with 1 N phosphate buffer of pH7, and the aqueous phase extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with a saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate, and freed from the solvent. The

purification of the raw product and the separation of the four stereoisomers 3a-d takes place with the help of preparative thin-layer chromatography (solvent: toluol / methanol, 90:10).

Compound 3a

Yield: 4 mg (12%).

Rf (toluol / methanol 90:10): 0.50

IR (Film): ν = 2961 (m, b, Sch), 1742 (vs), 1701 (vs), 1465 (m, Sch), 1389 (m, Sch), 1238 (s, Sch), 1210 (vs, Sch), 1011 (s, Sch), 957 (s, b, Sch), 808 (m, Sch), 768 (s, Sch) cm^{-1} .

UV (Methanol): λ_{max} ($\lg \epsilon$) == 210 (4.50), 248 (4.35) nm.

{page 5, column 7}

MS (20/70 ev): m/e (%) = 539 (40 [M+]), 457 (22), 362 (16), 316 (27), 222 (30), 178 (30), 164 (100), 151 (43), 96 (38), 69 (29), 55 (28), 43 (20).

High resolution: $\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{O}_7\text{NS}_2$

calculated: 539.2011 for [M⁺]

Compound 3b

Yield: 14 mg (13%).

Rf (toluol / methanol 90:10): 0.44

IR (Film): ν = 2963 (s, br, Sch), 1740 (vs), 1703 (s), 1510 (w), 1464 (m, br, Sch), 1389 (m, Sch), 1240 (s, br, Sch), 1142 (m), 1076 (w), 1037 (w), 1003 (m), 945 (s, br, Sch), 806 (m, Sch), 775

(s), 737 (m) cm^{-1} .

Uv (Methanol): λ_{max} ($\lg \epsilon$) == 211 (4.16), 250 (4.08) nm.

MS (20/70 ev): m/e (%) = 539 (27 [M $^+$]), 475 (17), 322 (41), 306 (67), 222 (16), 206 (17), 194 (19), 178 (32), 164 (100), 151 (33), 125 (18), 113 (15), 96 (39), 81 (23), 64 (58), 57 (42), 41 (19).

High resolution: $\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{O}_7\text{NS}_2$

calculated: 539.2011 for [M $^+$]

found: 539.1998

Compound 3c

Yield: 4 mg (4%).

Rf (toluol / methanol, 90:10): 0.38.

MS (20/70 ev): m/e (%) = 539 (51 [M $^+$]), 322 (22), 306 (53), 222 (36), 178 (31), 164 (100), 151 (41), 96 (25), 81 (20), 69 (26), 55 (25), 41 (25).

High resolution: $\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{O}_7\text{NS}_2$

calculated: 539.2011 for [M $^+$]

found: 539.2001

Compound 3d

Yield: 1 mg (1%).

Rf (toluol / methanol, 90:10): 0.33.

MS (20/70 ev): m/e (%) = 539 (69 [M $^+$]), 322 (35), 306 (51), 222

(41), 178 (31), 164 (100), 151 (46), 96 (31), 81 (26), 69 (34), 55 (33), 41 (35).

High resolution: $C_{26}H_{37}O_7NS_2$
calculated: 539.2011 for $[M^+]$
found: 539.1997

Compound 4a

10 mg (0.020 mmol) of epothilon A are dissolved in 2 ml of dichlormethane, cooled to -70° C, and then treated for 5 minutes with ozone until a pale blue color appears. The resulting reaction mixture is then mixed with 0.5 ml dimethyl sulfide and warmed to room temperature. To complete the process, the reaction mixture is freed from the solvent and finally purified by thin-layer chromatography (solvent: dichlormethane / acetone / methanol, 80:10:5).

Yield: 5 mg (64%).

Rf (dichlormethane / acetone / methanol, 85:10:5): 0.61.

IR (Film): ν = 3468 (s, br, Sch), 2947 (s, br, Sch), 1734 (vs, Sch), 1458 (w), 1380 (w), 1257 (w), 1157 (w), 1080 (w), 982 (w) cm^{-1} .

Uv (Methanol): λ_{max} ($lg \epsilon$) == 202 (3.53) nm.

MS (20/70 ev): m/e (%) = 598 (2 [M $^+$]), 380 (4), 267 (14), {page 6, column 9} 249 (17), 211 (20), 193 (26), 171 (34), 139 (34), 111 (40), 96 (100), 71 (48), 43 (50).

High resolution: $C_{21}H_{34}O_7$

calculated: 398.2306 for [M⁺]
found: 398.2295

{no compound 5a... present}

Compound 6a

10 mg (0.018 mmol) of 3,7-di-O-formyl-epothilon A are dissolved in 1 ml of dichlormethane, mixed with 29 μ l (0.180 mmol) of 1,8-diazobicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU), and stirred for 60 minutes at room temperature.

To complete the process, the reaction mixture is mixed with 1 M sodium di-hydrogen phosphate buffer of pH 4.5, and the aqueous phase extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with a saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate, and freed from the solvent.

After removal of the solvent, the resulting raw product is dissolved in 1 ml of methanol, mixed with 200 μ l of an ammoniacal methanol solution (2 mmol NH₃ / ml methanol), and stirred overnight at room temperature. To complete the process, the solvent is removed in a vacuum.

Yield: 4 mg (22%)

Rf (dichlormethane / acetone, 85:15): 0.46.

IR (Film): ν = 3445 (w, br, Sch), 2950 (vs, br, Sch), 1717 (vs, Sch), 1644 (w), 1466 (m, Sch), 1370 (m, Sch), 1267 (s, br, Sch),

1179 (s, Sch), 984 (s, Sch), 860 (w), 733 (m) cm^{-1} .
Uv [ultra-violet] (Methanol): λ_{max} ($\lg \epsilon$) == 210 (4.16) nm.
MS (20/70 ev): m/e (%) = 475 (28 [M^+]), 380 (21), 322 (37), 316 (40), 304 (66), 178 (31), 166 (100), 151 (29), 140 (19), 96 (38), 81 (20), 57 (26).

High resolution: $\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{O}_5\text{NS}$
calculated: 475.2392 for [M^+]
found: 475.2384

Compound 6b

50 mg (0.091 mmol) of 3,7-di-O-formyl-epothilon A are dissolved in 1 ml of dichlormethane, mixed with 2 ml (0.013 mol) of 1,8-diazobicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU), and stirred for 12 hours at a temperature of 90° C.

To complete the process, the reaction mixture is mixed with 1 M sodium di-hydrogen phosphate buffer of pH 4.5, and the aqueous phase extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with a saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate, and freed from the solvent.

The purification of the raw product which consists of two compounds takes place by means of preparative thin-layer chromatography (solvent: dichlormethane / acetone, 90:10)/
Yield: 7 mg (15%)

Substance code

Rf (dichlormethane / acetone, 90:10): 0.62.

IR (Film): ν = 2951 (m, br, Sch), 1723 (vs), 1644 (w, br, Sch), 1468 (w), 1377 (w), 1271 (m, br, Sch), 1179 (s), 987 (m, br, Sch), 735 (w, br, Sch) cm^{-1} .

Uv (Methanol): λ_{max} ($\lg \epsilon$) == 210 (4.44) nm.

MS (20/70 ev): m/e (%) = 503 (68 [M⁺]), 408 (58), 390 (32), 334 (25), 316 (34), 220 (21), 206 (27), 194 (20), 181 (33), {page 6, column 10} 164 (100), 151 (34), 139 (28), 113 (20), 96 (82), 81 (33), 67 (24), 55 (26), 43 (22).

High resolution: C₂₆H₃₇O₆NS

calculated: 503.2342 for [M⁺]

found: 503.2303

Compound 6c

5 mg (0.009 mmol) of 3,7-di-O-acetyl-epothilon A are dissolved in 1 ml of methanol, mixed with 150 μ l of an ammoniacal methanol solution (2 mmol NH₃ / ml methanol), and stirred overnight at a temperature of 50° C.

To complete the process, the solvent is removed in a vacuum. The purification of the raw product takes place with the help of preparative thin-layer chromatography (solvent: toluol / methanol, 90:10).

Yield: 3 mg (67%)

Rf (dichlormethane / acetone, 90:10): 0.55.

IR (Film): ν = 2934 (s, b, Sch), 1719 (vs, b, Sch), 1641 (m),

1460 (m, Sch), 1372 (s, Sch), 1237 (vs, b, Sch), 1179 (s, Sch),
1020 (s), 963 (s, Sch), 737 (vs) cm^{-1} .

Uv [ultra-violet] (Methanol): λ_{max} ($\lg \epsilon$) == 210 (4.33) nm.

MS (20/70 ev): m/e (%) = 517 (57 [M⁺]), 422 (58), 318 (31), 194
(20), 181 (34), 166 (100), 151 (31), 96 (96), 81 (32), 69 (27),
55 (29), 43 (69).

High resolution: C₂₈H₃₉O₆NS

calculated: 517.2498 for [M⁺]

found: 517.2492

Compound 7a

20 mg (0.041 mmol) of epothilon A are dissolved in 0.5 ml of methanol, mixed with 0.5 ml of caustic soda, and stirred for 5 minutes at room temperature.

To complete the process, the reaction mixture is mixed with 1 M phosphate buffer of pH 7 and the aqueous phase extracted four times with ethyl acetate. The combined organic phases are washed with a saturated sodium chloride solution, dried over sodium sulfate, and freed from the solvent. The purification of the raw product takes place with the help of preparative thin-layer chromatography (solvent: dichlormethane / acetone, 85:15).

Yield: 11 mg (52%)

Rf (dichlormethane / methanol, 85:15): 0.92

IR (Film): v = 3438 (s, br, Sch), 2971 (vs, br, Sch), 1703 (vs),
1507 (m), 1460 (s, Sch), 1383 (m, Sch), 1254 (w), 1190 (w, br,

Sch), 1011 (w, br, Sch), 866 (w, br), 729 (s) cm^{-1} .
MS (20/70 ev): m/e (%) = 423 (0.1 [M+]), 323 (4), 168 (89), 140
(100), 85 (31), 57 (67).

High resolution: $\text{C}_{23}\text{H}_{37}\text{O}_4\text{NS}$
calculated: 423.2443 for [M⁺]
found: 423.2410

Compound 7b

5 mg (0.009 mmol) of 7-O-acetyl-epothilon are dissolved in 1 ml of methanol, mixed with 200 μ l of an ammoniacal methanol solution (2 mmol NH₃ / ml methanol), and stirred for two days at a temperature of 50° C. To complete the process, the solvent is removed in a vacuum. The purification of the raw product takes place with the help of preparative thin-layer chromatography (solvent: toluol / methanol, 90:10). {page 7, column 11}

Yield: 3 mg (59%)

Rf (dichlormethane / methanol, 90:10): 0.63.
IR (Film): ν = 3441 (m, b, Sch), 2946 (s, Sch), 1732 (vs), 1600 (w), 1451 (m), 1375 (m), 1246 (s, b, Sch), 1013 (m, b, Sch) cm^{-1} .
Uv (Methanol): λ_{max} ($\lg \epsilon$) == 211 (3.75), 247 (3.59) nm.
MS (20/70 ev): m/e (%) = 567 (1 [M⁺]), 465 (4), 422 (7), 388 (5), 194 (5), 182 (7), 168 (65), 164 (17), 144 (100), 97 (10), 71 (22), 43 (27).

High resolution: $\text{C}_{29}\text{H}_{45}\text{O}_8\text{NS}$
calculated: 567.2866 for [M⁺]

found: 567.2849

Patent claims

1. Epothilon derivates of formula 1

{formula 1}

here, R = H, C₁- to C₄-alkyl; R¹, R² = H₂C₁- to C₆-alkyl, C₁- to C₆-acyl-benzoyl, C₁- to C₄-trialkylsilyl, benzyl, phenyl, C₁- to C₆-alkoxy-, C₆-alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl or phenyl; and in connection with the alkyl or acyl groups contained in the residues, it involves straight-chained or branched residues; and X and Y are either equal or different, and stand in the respective case for halogen, OH, O--(C₁- to C₆)-acyl, O--(C₁- to C₆)--alkyl, O--benzoyl.

2. Epothilon derivates of formula 2

{page 7, column 12}

{formula 2}

here, R = H, C₁- to C₄-alkyl; R¹, R², R³ = H₂C₁- to C₆-alkyl, C₁- to C₆-acyl-benzoyl, C₁- to C₄-trialkylsilyl, benzyl, phenyl, C₁- to C₆-alkoxy-, C₆-alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl or phenyl; and in connection with the alkyl or acyl groups contained in the residues, it involves straight-chained or branched residues.

3. Epothilon derivates of formula 3

{formula 3}

here, R = H, C₁- to C₄-alkyl; R¹, R² = H₂C₁- to C₆-alkyl, C₁- to C₆-acyl-benzoyl, C₁- to C₄-trialkylsilyl, benzyl, phenyl, C₁- to C₆-alkoxy-, C₆-alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl or phenyl; and in connection with the alkyl or acyl groups contained in the residues, it involves straight-chained or branched residues; and X generally stands for --C(O)--, --C(S)--, --S(O)--, --CR¹R²--, and --SiR₂, in which case R, R¹ and R² have the meaning given above.

4. Epothilon derivates of formula 4

{page 8, column 13}

{formula 4}

here, R = H, C₁- to C₄-alkyl; R¹, R² = H₂C₁- to C₆-alkyl, C₁- to C₆-acyl-benzoyl, C₁- to C₄-trialkylsilyl, benzyl, phenyl, C₁- to C₆-alkoxy-, C₆-alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl or phenyl; and in connection with the alkyl or acyl groups contained in the residues, it involves straight-chained or branched residues; and X means oxygen, NOR³, N--NR⁴R⁵, and N--NHCONR⁴R⁵, in which case the residues R³ to R⁵ have the meaning given above.

5. Epothilon derivates of formula 5

{formula 5}

here, R = H, C₁- to C₄-alkyl; R¹, R² = H₂C₁- to C₆-alkyl, C₁- to C₆-acyl-benzoyl, C₁- to C₄-trialkylsilyl, benzyl, phenyl, C₁- to C₆-alkoxy-, C₆-alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl or

phenyl; and in connection with the alkyl or acyl groups contained in the residues, it involves straight-chained or branched residues; and X means hydrogen, C₁- to C₁₂-alkyl, C₁- to C₁₆-acyl, benzyl, benzoyl, and cinnamoyl.

6. Epothilon derivates of formula 6

{page 8, column 14}

{formula 6}

here, R = H, C₁- to C₄-alkyl; R¹, R² = H₂C₁- to C₆-alkyl, C₁- to C₆-acyl-benzoyl, C₁- to C₄-trialkylsilyl, benzyl, phenyl, C₁- to C₆-alkoxy-, C₆-alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl or phenyl; and in connection with the alkyl or acyl groups contained in the residues, it involves straight-chained or branched residues.

7. Epothilon derivates of formula 7

{formula 7}

here, R = H, C₁- to C₄-alkyl; R¹, R² = H₂C₁- to C₆-alkyl, C₁- to C₆-acyl-benzoyl, C₁- to C₄-trialkylsilyl, benzyl, phenyl, C₁- to C₆-alkoxy-, C₆-alkyl-, hydroxy- and halogen-substituted benzyl or phenyl; and in connection with the alkyl or acyl groups contained in the residues, it involves straight-chained or branched residues.

8. An agent for the protection of plants in agriculture, forestry, and/or gardening, as it consists of one or several of

the compounds pursuant to one of the preceding claims, or as it consists of one or several of these compounds in conjunction with one or several of the usual carrier(s) or dilutant(s).

9. A therapeutic agent, particularly for use as a cytostatic, as it consists of one or several of the compounds included in one or several of claims 1 through 7, or as it consists of one or several {page 9, column 15} of these compounds included in one or several of claims 1 through 7 in conjunction with one or several of the usual carrier(s) or dilutant(s).

{page 9, column 16 is blank}

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.